

小鼠单核细胞吞噬过程中某些生化特征的改变*

方 丁*** 王慧芬** 张元杏** 苏美琨***

为了探讨某些因素对机体防御机能,特别是对吞噬作用的影响机制,首先研究了小鼠腹腔单核细胞吞噬过程中某些代谢活动的改变。

以 0.01% 糖元溶液注射于小鼠腹腔,5 日后,洗出腹腔内细胞,经洗涤后用于试验。如此获得的细胞 95% 以上为单核细胞,其中 40—50% 为大单核细胞,其余为淋巴球。被吞噬物为加热杀死的金黄色葡萄球菌,细菌与细胞按 10:1 混合。于 37℃ 恒温水浴内进行体外吞噬试验。在保温 30 分钟和 2 小时后,分别取标本检查吞噬百分率和蛋白酶及脱氢酶的活性,同时测定培养体系中乳酸的产生。这些代谢指标的改变与同样处理而不加细菌的对照组进行比较。

结果说明,在吞噬进行 30 分钟以后,吞噬百分率已达 50—60%, 平均每个细胞内吞噬菌 4—6 个,2 小时结果与此近似。琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、柠檬酸脱氢酶、醋酸脱氢酶、G-磷酸葡萄糖脱氢酶、甘油脱氢酶、磷酸甘油脱氢酶、丙酮酸脱氢酶及 α -酮戊二酸脱氢酶的活性,在吞噬细胞中均增高,并在 30 分钟时已可明显观察到。pH 7.6 和 pH 3.5 蛋白酶的活性,在 30 分钟时增强, pH 6.0 蛋白酶改变不明显。乳酸产生在吞噬体系中比对照组显著增高。总结以上结果,可以认为小鼠单核细胞在吞噬死的金黄色葡萄球菌过程中,代谢活动有所增强。

吞噬作用是机体的重要防御机能之一。关于其免疫机制,学者们曾从多方面进行过研究,近年来更注意到对此过程的生化改变的研究^[1,2]。虽然工作仅为初步,但这是一个良好的开端,因为这可能更接近于阐明吞噬过程的本质。

我们考虑吞噬过程中代谢强度的改变,应该是以某些酶活性改变为基础的。所以我们对吞噬过程中的乳酸生成和吞噬细胞内某些脱氢酶和蛋白酶的活性进行了初步研究。

材料和方法

动物 健康小白鼠,昆明种,体重 15—18 克,雌雄不分。实验期间以 80% 玉米粉和 20% 豆粉混合制成的烤饼和高粱为饲料。任意饮水。

菌种 金黄色葡萄球菌,系新自病人脓标本

中分离出,血浆凝固酶阳性,发酵甘露醇,有溶血能力。普通琼脂斜面培养,置 4℃ 冰箱中保存。每月传代 1 次。

菌液制备 取以上冰箱保存的菌株接种肉汤管,37℃ 培养 12 小时后,取 0.5 毫升接种于克氏瓶,培养 14—16 小时,用无菌生理盐水洗下,经 4000 转/分离心 20 分钟,将菌沉下。再用无菌生理盐水洗 2 次,最后经 80℃ 加温 1 小时杀死。置冰箱保存备用,应用日期不超过 1 个月。用时以 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 KRP 溶液)稀释至 15×10^8 细胞/毫升(用光电比色计比浊,使其浊度与 McFarland 标准比浊管的第 5 管浊度相当)。

* 本文研究过程中承蒙谢少文教授热情指导,谨致谢意。徐文兰、张安意、魏素珍等同志参加部分技术操作,特此致谢。

** 河北医学院微生物学教研组,石家庄。

*** 河北医学院生物化学教研组,石家庄。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

细胞制备 细胞制备方法系按 Mitsuhashi^[3]法进行。于小鼠腹腔注射 0.01% 糖元 1 毫升。5 日后,腹腔注射冰冷的 KRP 溶液(含 5 毫克%肝素)1 毫升,立刻断头杀死。轻揉腹部之后,打开腹腔,将腹腔液吸出,约 20 只小鼠混在一起。经 2000 转/分离心 5 分钟,将细胞沉下,再用 KRP 溶液洗 2 次。最后将细胞悬于 20% 兔血清(56℃ 30 分钟灭活者) KRP 溶液内,经 500 转/分离心 30 秒钟,沉下粗块。吸出上面的细胞悬液,按普通白血球计数法计细胞数,最后制成 15×10^6 细胞/毫升的浓度。这样所得到的细胞皆为单核细胞,其中大吞噬细胞约半数,其余为淋巴球,多核细胞很少见。用 0.5% 伊红作为细胞计数稀释液,死细胞在 5% 以下。以上全部操作均在冰浴中进行。

吞噬试验 取细胞悬液(15×10^6 细胞/毫升)与菌液在 250 毫升锥形瓶内混合,使细菌与细胞的最终比例为 10:1。置 37℃ 水浴内,不时震荡。经 30 分和 120 分钟以后,分别各取出 0.5 毫升测定乳酸;0.5 毫升测定脱氢酶;1 毫升测定蛋白酶。另 0.5 毫升离心将细胞沉下,然后推片,做 Wright 染色。计算 200 个大吞噬细胞中吞菌细胞百分数,做为吞噬强度的指标。

对照管以 KRP 溶液代替菌液同样进行试验,作为生化指标的对照。

乳酸的测定 按 Barker 和 Summerson 法^[4]进行。沉淀蛋白用三氯醋酸,其最终浓度为 2.5%。在全部操作过程中试管都加盖,以防污染或损失。显色后,在 30 分钟内用 Coleman 6 型分光光度计于 560 毫微米比色。

脱氢酶活性测定 按 Curl 方法^[5]加以改变。取与细菌作用一定时间后的细胞悬液 0.5 毫升,离心去上清液,再用冰冷的生理盐水洗 2 次,最后除去上清液。对照管同样处理。然后于实验管和对照管分别加入 0.1% 氯化三苯基四氮唑水溶液 40 微升,和 0.04 M 基质液(用 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液配成)80 微升。以上操作全在冰浴中进行。加好后立即放入 37℃ 水浴,待细胞一出现红色即为终点,立即记录显色所需的时间(秒),以“T”代表。酶活性按下式表示:

$$\text{酶活性指标} = \frac{1}{T} \times \text{细胞数}$$

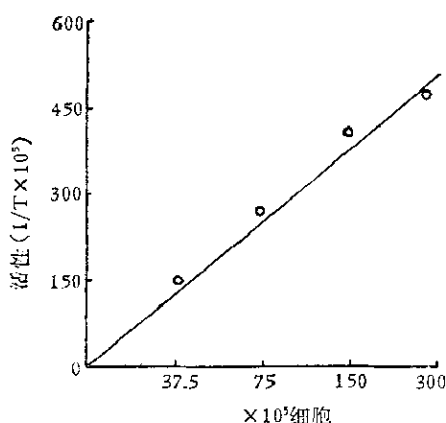


图 1 细胞浓度与脱氢酶活性的关系,基质及琥珀酸纳

用以上方法测得吞噬细胞数和酶活性在一定范围内呈直线关系(图 1)。

蛋白酶活性测定 按 Mounter 法^[6]进行。酶活性以酶水解酪蛋白的产物和酚试剂显色强度的光密度(Coleman, 6 型, 660 毫微米)表示之。

结 果

(一) 吞噬强度和吞噬过程中乳酸的生成

由表 1 可见,在细胞和细菌作用 30 分钟时,已有很明显的吞噬作用,吞噬细胞数已达 55%,此时,试验组的乳酸产量比对照组低(减少 11.7%)。在有细菌存在时,吞噬作用仍继续进行,至 120 分钟,吞菌细胞达 72.5%,比 30 分钟时增高 31.8%。而每个细胞内平均吞菌数,两组都在 4—6 个之间无明显差别。随着吞噬作用的增强,至 120 分钟时,试验组的乳酸产量比对照组高 35.5%,显著地增加了。

(二) 吞噬过程中细胞脱氢酶活性的改变

本实验共测定了 8 种脱氢酶的活性,结果见表 2。

由表 2 可见,在吞噬作用早期(30 分钟),进行吞噬活动的细胞比对照细胞氧化琥珀酸、异柠檬酸、甘氨酸、甘油、磷酸甘油的作用强。至 2 小时后,虽然吞噬作用尚

表 1 小白鼠单核吞噬细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬百分数和吞噬时生成乳酸量
(微克分子/750,000 细胞)

实 验 号	吞 噬 30 分 钟			吞 噬 120 分 钟		
	对照组	实验组	吞噬%	对照组	实验组	吞噬%
1	0.329	0.243	62	0.678	0.891	80
2	0.340	0.314	47	0.652	0.828	71
3	0.311	0.293	65	0.627	0.825	80
4	0.298	0.282	48	0.494	0.723	63
5	0.301	0.276	48	0.511	0.652	59
6	0.321	0.274	60	0.411	0.696	82
平 均	0.317±0.016	0.280±0.024	55	0.561±0.106	0.760±0.098	72.5
增減%	-11.7		—	+33.5		+32*
显著性	0.05>P>0.01 (显著)			P<0.01 (很显著)		

* 和 30 分钟时相比。

表 2 单核细胞吞噬葡萄球菌后脱氢酶活性

基 质	吞 噬 30 分 钟			吞 噬 120 分 钟		
	对 照	实 验	Δ ₁	对 照	实 验	Δ ₂
琥珀酸钠	234 (119—299)	292 (238—323)	+25%	292 (224—371)	300 (233—371)	+3%
乳酸	105 (91—111)	102 (81—128)	—	254 (111—371)	314 (128—471)	+23%
异柠檬酸钠	141 (104—278)	213 (167—333)	+51%	98 (92—104)	106 (95—118)	+8%
6-磷酸葡萄糖	191 (83—417)	215 (111—476)	+13%	147 (83—303)	148 (98—198)	—
甘油	199 (115—289)	237 (142—367)	+19%	198 (117—369)	236 (131—375)	+19%
谷氨酸钠	226 (91—391)	229 (111—391)	—	187 (74—271)	216 (104—426)	+16%
甘氨酸	179 (77—303)	216 (90—384)	+20%	52 (34—63)	60 (41—80)	+15%
磷酸甘油钠	169 (52—370)	196 (59—416)	+16%	72 (46—98)	82 (51—101)	+13%

注：1) Δ₁、Δ₂ 分别表示细胞吞噬 30 分钟和 2 小时的实验组较对照组酶活性增减百分数。

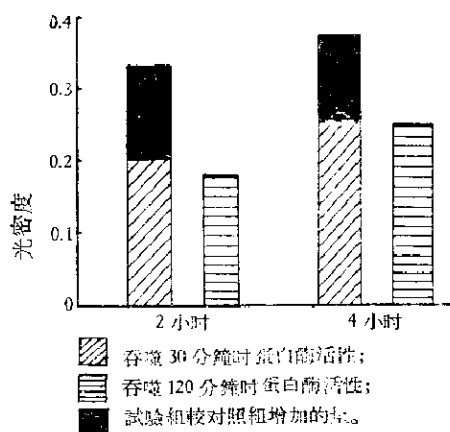
2) 以上酶活性均以 7,500,000 细胞计。

在继续进行,但除乳酸、甘油和琥珀酸脱氢酶外,无论试验组或对照组细胞对其它各种基质的氧化能力普遍下降。但进行吞噬活动的细胞对大多数基质的氧化能力仍相对地高于对照组。唯乳酸脱氢酶活性至 2 小时大大增高,且试验组显著高于对照组。

(三) 吞噬过程中细胞蛋白酶活性的改变

蛋白酶系细胞内酶。在实验中见到,

如果不将细胞用界面活性物质溶解,使酶释放出来,就无法进行酶活性的测定。但常用的界面活性物质(如皂角素、胆盐等)都能和酚试剂产生蓝色反应,影响实验结果。为此,必须控制使用的界面活性物质的浓度,使其在最低需要浓度(本实验中用 0.15% 胆盐)。在比色时并应作空白管,以消去由胆盐所生成的颜色。实验结果见图 2。



横坐标示酶促反应时间

图2 单核细胞吞噬过程中蛋白酶活性

由图2可见,在细胞和细菌作用30分钟时,吞噬细胞内pH 3.5,蛋白酶的活性显著高于对照组(约增40%)。在作用120分钟后,试验组和对照组的差别消失。酶促反应达4小时和反应2小时者结果相仿。

讨 论

在正常吞噬细胞中,酵解作用本来很强,在吞噬作用时则更强。并且有人认为酵解过程的增强与供给吞噬细胞的能量有关^[7]。Karnovsky等认为吞噬细胞和未吞噬细胞的乳酸产量的差别,只能在培养45分钟以内测出^[8],但也有人证明只要有吞噬活动存在,即可呈现这种差别^[9]。在我们的实验条件下,吞噬体系充分和空气接触,在30分钟后,吞噬率已达55%,此时乳酸生成量却减低,这和Cohn的结果不一致。可能由于大量空气的存在,有利于吞噬细胞的有氧氧化过程。由以上脱氢酶的结果也可看出,在30分钟时,吞噬的细胞有氧氧化过程显著加强了。以前也曾有人证明过细胞吞噬颗粒时乳酸含量下降^[10]。我们在预备试验中也曾观察到,当吞噬作用在小体积反应瓶中进行时,吞噬组的乳

酸产量则从开始(30分钟)就一直高于对照组。在生物体内,吞噬细胞一般是处于氧气足够的环境中,因此,我们认为使吞噬体系有充分的空气,似能更接近于自然状态。在2小时后,随着吞噬作用的增强,试验组的乳酸产量也显著增高,这可能与吞噬细胞的能量消耗增加有关^[7]。

脱氢酶的结果说明在30分钟时有氧化显著增强了。这可能与吞噬细胞进行阿米巴运动消耗能量有关^[11]。在2小时后,乳酸脱氢酶活性显著增加,可能与此大量生成乳酸有关。但此时大多数其他脱氢酶的活性却下降,反映细胞的代谢强度有所改变。其具体机制尚待今后的研究来阐明。Allison等^[12]曾检查了家兔大吞噬细胞中11种脱氢酶的活性,并证明当机体机能状态改变时,可以引起某些脱氢酶活性的改变。可见进一步探求这些酶类的活性变化和机体反应性的联系还是很有意义的。

早在1940年, Barnes^[13]已经发现白血球中存在蛋白酶,并已知此酶类的最适pH为3.0—3.5, 5.5—6.0和7.6—8.0^[6]。我们观察到小鼠单核细胞在吞噬后,pH 3.5蛋白酶的活性显著增高。这可能是因为吞噬细胞中大量产酸,pH下降,有利于酶促反应。

Hirsch^[14]认为蛋白酶是吞噬细胞的杀菌因素。Lapresle^[15]认为吞噬细胞中蛋白酶的功能在于使抗原水解,其水解产物可促进机体合成抗体。可见研究吞噬细胞内蛋白酶的生物学意义,应为传染免疫机制研究中的重要课题。

由以上可以看出,在吞噬过程中,吞噬细胞内的生物化学改变是非常复杂的,而且这些改变和酶的功能有联系。但对这些反应的生物学意义的阐明,还需要进行许多工作。

参 考 文 献

- [1] Karnovsky, M. L.: *C. R. Sec. Biol.*, **156**: 1008—1012, 1962.
- [2] 谢少文: 免疫学进展, 109—131, 上海科学技术出版社, 1962.
- [3] Mitsuhashi, S., Sato, I. and Tanaka, T.: *J. Bact.*, **81**:863—868, 1961.
- [4] Barker, S. B. and Summerson, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **138**:535—554, 1941.
- [5] Curl, H. and Sandberg, S. J.: *Marine Res.*, **19**:123—138, 1961.
- [6] Mounter, L. A. and Atiyeh, W.: *Blood*, **15**: 52—59, 1960.
- [7] Sbarra, A. J. and Karnovsky, M. L.: *J. Biol. Chem.*, **234**:1355—1362, 1959.

- [8] Karnovsky, M. L.: *Physiol. Rev.*, **42**:143—168, 1962.
- [9] Cohn, Z. A. and Morse, S. I.: *J. Exp. Med.*, **111**:667—687, 1960.
- [10] Suter, E.: *Bact. Rev.*, **20**:94—132, 1956.
- [11] Пучков, H. B.: *Биохимия*, **20**: 709—713, 1955.
- [12] Allison, M. J., Zappasodi, P. and Lurie, M. B.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **84**:364—370, 1961.
- [13] Barnes, J. M.: *Brit. J. Exp. Path.*, **21**:264—271, 1940.
- [14] Hirsch, J. G.: *Bact. Rev.*, **24**:133—140, 1960.
- [15] Lapresle, C. and Webb, T.: *Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity*, 44—58, 1960.

ALTERATIONS IN THE METABOLIC CHARACTERISTICS OF MOUSE MONONUCLEAR CELLS DURING PHAGOCYTOSIS

FANG TING***, WANG HUEI-FEN**, CHANG YUAN-XING** AND SU MEI-KUNG***

(*Department of Microbiology, Hopei Medical College, Shijiazhuang)

(**Department of Biochemistry, Hopei Medical College, Shijiazhuang)

In the present report, the mononuclear cells from mouse peritoneal exudate were used in the experiments and heat killed *Staphylococcus aureus* was utilized as ingesting particles. In order to study the alterations in the metabolic characteristics of the mononuclear cells during phagocytosis, the formation of lactic acid, and the activities of some dehydrogenases and proteinase were investigated. The results are summarized as follows.

It is found that the mouse mononuclear cells

could ingest intensely the organisms without the participation of specific antibody and complement. Phagocytosis was increased in intensity within two hours of the beginning of the test. In contrast with the controls, the quantity of the lactic acid formation was increased during phagocytosis, and the activities of certain dehydrogenases i. e., succinic, iso-citric, glycine, glycerol and phospho-glycerol as well as the activity of proteinase (active at pH 3.5) were also markedly increased.